

# **DAS VERHALTEN VON HUMANPLASMIN GEGEN PROTEASENINHIBITOREN**

Ein Beitrag zur Differenzierung zwischen  
Humanplasmin und Humanserumkallikrein

Wolfgang Graf von Kalckreuth

1973







Aus dem Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie  
der Universität München

Komm. Leitung: Privatdozent Dr. H. Fritz

# DAS VERHALTEN VON HUMANPLASMIN GEGEN PROTEASENINHIBITOREN

Ein Beitrag zur Differenzierung zwischen Humanplasmin und  
Humanserumkallikrein

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin  
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Wolfgang Graf von Kalckreuth  
aus Marburg

München 1972



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Privatdozent Dr. rer. nat. Johann Fritz

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. Eugen Werle

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Dezember 1973

# Inhalt

## Zusammenfassung

|                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Einleitung                                                                                    | 4  |
| 1. Methodik                                                                                   | 5  |
| 1.1. Die Nachweisverfahren                                                                    | 5  |
| 1.2. Molaritätsbestimmung des Humanplasmin                                                    | 9  |
| 1.3. Dissoziationskonstantenbestimmung nach GREEN & WORK                                      | 9  |
| 2. Material und Messungen                                                                     | 11 |
| 3. Ergebnisse                                                                                 | 14 |
| 4. Vergleich des Hemmverhalten von Humanserumkallikrein<br>mit dem Verhalten des Humanplasmin | 15 |
| Anhang - Affinitätschromatographie mit Humanplasmin                                           | 16 |
| Abbildungen                                                                                   | 20 |
| Tabellen                                                                                      | 24 |
| Literatur                                                                                     | 26 |



## Zusammenfassung

Untersucht wurde die Hemmwirkung von Proteinaseinhibitoren auf Humanplasmin, wobei das synthetische Substrat N-benzoyl-L-arginin-äthylester zur Aktivitätsmessung verwendet wurde.

1. Das pH-Optimum der Spaltungsreaktion liegt bei 7,5 .  
Die Spaltungsaktivität wird in Gegenwart von Ca- und Mg-Ionen und Spuren von Schwermetallionen nicht beeinflusst.
2. Humanplasmin wurde mit einer Reihe von Proteinaseinhibitoren titriert. Mit Hilfe der Titrationskurven lassen sich für die Komplexe von fünf Proteinaseinhibitoren (Trypsin-Kallikrein-Inhibitor, Kunitz-Soja-Bohnen-Inhibitor, Seeanemonen-Inhibitor, Meerschweinchen-Sperma-II-Inhibitor und Bdeelline-A-Inhibitor) mit Humanplasmin die Inhibitorkonstanten  $K_i$  berechnen. Sie liegen im Bereich von  $3 \times 10^{-10} \text{ M}$ .

Es wurden Inhibitoren gefunden, die Humanplasmin hemmen, nicht jedoch Humanserumkallikrein: Bdeelline-A-Inhibitor, Bdeelline-B-Inhibitor, Kartoffel-Inhibitor und Cow-Colostrum-Inhibitor.

Durch Zusatz dieser Inhibitoren zu Serumkallikrein-Plasmin-Mischungen ist es deshalb möglich, die esterspaltende Wirkung der beiden Enzyme eindeutig zu unterscheiden.

Das verwendete Humanplasmin wurde mittels Affinitätschromatographie an wasserunlöslichem Trypsin-Inhibitor um den Faktor 8,5 angereichert.

## Einleitung

Am Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie beschäftigt sich seit einiger Zeit ein Arbeitskreis mit der Isolierung des Serumkallikrein aus Säuger- und Humanserum. Kallikreine sind Proteasen, die dadurch definiert sind, daß sie aus bestimmten Plasmafraktionen - den Kininogenen - Kinine abspalten. Kinine sind Oligopeptide, deren physiologische Wirkung besonders in einer starken Blutdrucksenkung besteht. Kallikreine finden sich in ihren Vorstufen - den Praekallikreinen - in zahlreichen Organen wie z.B. dem Pankreas und im Serum.

Plasmin (EC 3.4.4.14) ist eine Protease vom Molekulargewicht 75 400 (6), deren inaktive Vorstufe - das Plasminogen - sich in Säugerplasma findet. Plasmin ist der Hauptrepräsentant des Fibrinolytischen Systems. Seine physiologische Bedeutung liegt im Abbau des Fibrin. Plasmin spaltet allgemein Lysyl- und Arginylbindungen. Daher werden auch zahlreiche andere Proteine außer Fibrin gespalten. Serumkallikrein hat demgegenüber eine eingeschränkere Spaltungswirkung. Die Fähigkeit des Plasmin, auch bestimmte synthetische Ester zu hydrolysieren, nutzt man zur Aktivitätsbestimmung aus.

Ausgangspunkt vergleichender Untersuchungen zwischen Serumkallikrein auf der einen und Plasmin auf der anderen Seite ist die strittige Frage, ob Plasmin auch eine Kininogenasenaktivität besitzt. Mit anderen Worten: Kann Plasmin ebenso wie Serumkallikrein von Kininogenen Kinine abspalten? Diese Frage ist deshalb so wichtig, weil bisher eine Verunreinigung der Plasminpräparationen durch Serumkallikrein nicht ausgeschlossen werden konnte (3).

Ziel dieser Arbeit war es nun, Bedingungen zu finden, unter denen sich die Wirkungen des Humanplasmin eindeutig von den Wirkungen des Humanserumkallikrein differenzieren lassen.

Es muß darauf hingewiesen werden, daß in dieser Arbeit ausschließlich Humanplasmin untersucht wird. WUNDERER (12) hat die entsprechende Untersuchung für Humanserumkallikrein vorgelegt. Außerdem ist es nicht gleichgültig, ob Humanplasmin bzw. Humanserumkallikrein oder Schweineplasmin bzw. Schweineserumkallikrein für die Untersuchung verwendet wird. Enzyme besitzen eine speziebedingte Struktur, so daß bei "wirkungsgleichen" Enzymen, gewonnen von

verschiedenen Arten, trotzdem speziebedingte Wirkungsunterschiede auftreten können.

Außerdem wurde gezeigt, daß sich ein käufliches Plasminpräparat auf einfache Weise mit dem Verfahren der Affinitätschromatographie (9, 10) weiter reinigen läßt.

## 1. Methodik

Proteasen lassen sich nicht nur, wie allgemein bekannt, durch ihre Fähigkeit definieren, Proteine zu hydrolisieren. Es gibt noch einen anderen Weg ihrer Charakterisierung: In den Organismen zahlreicher Tiere und Pflanzen finden sich Proteine mit der Fähigkeit, Proteasen zu hemmen. Man nennt diese Proteine Proteaseninhibitoren (6). Da fast jede Protease ein unterschiedliches Verhalten gegenüber den verschiedenen Inhibitoren besitzt, läßt sich dieses Verhalten zur Charakterisierung der Protease benutzen.

Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkung des Humanplasmin gegenüber der Wirkung des Humanserumkallikrein abzugrenzen. Verschiedenheit beider Enzyme vorausgesetzt, war ein unterschiedliches Verhalten gegen gleiche Inhibitoren zu erwarten. Dies sollte möglichst quantitativ erfaßt werden.

### 1.1. Die Nachweisverfahren

#### 1.1.1. Der BAPA-Test (6)

Bereits in Vorversuchen ergab sich, daß Humanplasmin im Gegensatz zu Schweineplasmin das Substrat BAPA (N-alpha-benzoyl-DL-arginin-4-nitroanilid) nicht spaltet. BAPA ist ein sehr günstiges Substrat für Aktivitätsmessungen, weil das bei der enzymatischen Spaltung freigesetzte p-Nitroanilin Licht der Wellenlänge 405nm absorbiert. Diese Wellenlänge ist im Spektrum einer Quecksilberlampe enthalten, so daß sich die Spaltung direkt am Photometer Eppendorf verfolgen läßt.

Da der BAPA-Test als Nachweismethode für Humanplasmin ungeeignet war, mußte eine neue Methode gefunden werden. Deshalb wurde der direkte BAEE-Test für die geplanten Untersuchungen ausgearbeitet.

Um die spezifische Hemmaktivität der von uns benutzten Proteininhibitoren gegen Trypsin zu bestimmen, verwendeten wir den BAPA-Test. Man benötigt diesen Wert, um die Hemmaktivität der verschiedenen Inhibitoren vergleichen zu können.

Meßmethode:

Gerät: Photometer Eppendorf

Meßtemperatur: 25°C

Wellenlänge: 405nm

Schichtdicke:  $d = 1\text{cm}$

Endvolumen: 3ml

Extinktionskoeffizient:  $\varepsilon_{405} = 9,95 \times 10^6 \text{cm}^2 \text{Mol}^{-1}$

1 mU Trypsin entspricht einem  $\Delta E \times \text{min}^{-1}$  von 0,00332

Ansatz:

1. 10µg Trypsin in 0,001n HCl
2. 0,1M TRA-Puffer, pH 7,8 ad Endvolumen von 2ml
3. Inhibitorlösung
4. 1ml 0,1%ige BAPA-Lösung (nach 15min Vorinkubation)

Die Extinktionsänderungen wurden über 10min abgelesen und daraus der Mittelwert der Extinktionsänderung pro Minute errechnet. Die graphische Darstellung der Trypsinaktivität in U als Funktion der Inhibitorkonzentration in µg pro Meßansatzvolumen oder Mol pro Liter ergibt eine Gerade, aus deren Steigung sich die spezifische Hemmaktivität des Inhibitors in Inhibitorunits (IU) ermitteln ließ.

### 1.1.2. Der direkte BAEE-Test (8)

Es war bekannt (8), daß Humanplasmin BAEE (N-alpha-benzoyl-L-arginin-äthylester) in Benzoylarginin und Äthylalkohol spaltet. Benzoylarginin und BAEE absorbieren Licht im UV-Bereich bei 253nm. Die Differenz beider Absorptionskoeffizienten ist mit  $\Delta \varepsilon_{253} = 1,15 \times 10^6 \text{cm}^2 \text{Mol}^{-1}$  (8) relativ klein. Es zeigte sich bald, daß die Lichtleistung verschiedener Spektralphotometer bei dieser kurzen Wellenlänge und der relativ hohen absoluten Absorption nicht ausreichte, um reproduzierbare Meßwerte bei niedrigem Rauschpegel zu erhalten. Nur das Spektralphotometer PM Q II von Carl Zeiss erwies sich als geeignet.

Die Meßergebnisse wurden von einem Schreiber aufgezeichnet.

Dadurch konnten wir über 10min auf 0,002 Extinktionseinheiten genau messen. Diese Genauigkeit war für Aktivitätsmessungen in der Nähe des Äquivalenzpunktes der Titration von Humanplasmin mit Inhibitoren unbedingt notwendig. Mit dem PM Q II und dem Schreiber kombinierten wir eine Küvettenwechselautomatik, die es gestattete, bei einem Enzym-Vergleichswert pro Versuch fünf Hemmessungen durchzuführen. Der Enzym-Vergleichswert wurde jedesmal automatisch auf Extinktion 0 abgeglichen. Abbildung 1 zeigt ein Meßprotokoll des Schreibers.

#### Meßmethode:

Gerät: Spektralphotometer Zeiss PM Q II mit Küvettenwechselautomatik für sechs Küvetten kombiniert mit Direktschreiber

Meßtemperatur: 25°C

Wellenlänge: 253nm

Schichtdicke:  $d = 1\text{cm}$

Endvolumen: 3ml

Extinktionskoeffizientendifferenz:  $\Delta \varepsilon_{253} = 1,15 \times 10^6 \text{cm}^2 \text{Mol}^{-1}$

1mU Plasmin entspricht einem  $\Delta E \times \text{min}^{-1}$  von 0,000385

#### Ansatz:

1. 200ug Humanplasmin in 100ul 0,1M TRA-Puffer von pH 7,8
2. 0,1M TRA-Puffer von pH 7,8 ad Endvolumen von 2,5ml
3. Inhibitor, gelöst im gleichen TRA-Puffer
4. 0,5ml 0,1%ige BAEE-Lösung nach einer Vorinkubation von 15min in der Küvette bei 25°C

Die Extinktionen wurden über mindestens 10min gemessen. Die Skalenspreizung des Schreibers betrug 0,2 Extinktionseinheiten, die Spaltbreite des Photometers ca. 0,4mm. Die Extinktionszunahme pro Zeiteinheit wurde graphisch bestimmt und in eine Titrationskurve übertragen (Abb. 1 und 3).

Bei den Messungen mußte sorgfältig auf Konstanz der physikalischen Bedingungen geachtet werden, da sonst erhebliche Abweichungen von der Linearität des Extinktionsanstieges zu verzeichnen waren. Da die BAEE-Lösung nach Zugabe in die Küvette starke Schlieren bildet, verwendeten wir keine Rührer zum Mischen des Küvetteninhalts, sondern schüttelten die Küvetten nach Verschluß mit Teflondeckplatten.

### 1.1.3. Der indirekte BAEE-Test (8)

Der bei der Spaltung von BAEE freigesetzte Äthylalkohol kann mittels Alkoholdehydrogenase und  $\text{NAD}^+$  unter geeigneten Bedingungen zu Acetaldehyd oxidiert und  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH} + \text{H}^+$  reduziert werden. Die Konzentration von NADH kann bei 334nm im Photometer Eppendorf bestimmt werden.

Dieser indirekte Test (8) schied für die Titration von Humanplasmin mit Inhibitoren aus, weil man mit Rücksicht auf die Alkoholdehydrogenase bei einem pH von 8,7 arbeiten muß. Das hohe pH vermindert die Aktivität des Humanplasmin. Man müßte außerhalb des Optimum der Aktivität arbeiten.

Wir verwendeten den Test nur bei der im Anhang beschriebenen Versuchsreihe.

#### Meßmethode:

Gerät: Photometer Eppendorf

Meßtemperatur:  $25^{\circ}\text{C}$

Wellenlänge: 334nm

Schichtdicke:  $d = 1\text{cm}$

Endvolumen: 3ml

Extinktionskoeffizient:  $\epsilon_{334} = 6 \times 10^6 \text{cm}^2 \text{Mol}^{-1}$

1mU Plasmin entspricht einem  $\Delta E \times \text{min}^{-1}$  von 0,002

#### Ansatz:

1. Enzymlösung
2. Pyrophosphatpuffer pH 8,7 ad Endvolumen von 2,4ml
3. 0,1ml NAD-Lösung
4. 20µl ADH-Suspension
5. 0,5ml 0,1%ige BAEE-Lösung

## 1.2. Die Bestimmung der Molarität des Humanplasmin

Für die Auswertung unserer Inhibitionsmessungen mußten wir die Molarität des Enzyms im Küvettenansatz kennen. Es gibt grundsätzlich zwei Wege, diese Molarität zu bestimmen:

Der einfachste und genaueste Weg ist die direkte Titration der untersuchten Protease mit p-Nitrophenyl-p'-guanidinbenzoat (NPGB). Das Enzym spaltet von NPGB unter Bildung eines Acyl-Enzym-Komplexes p-Nitrophenol ab. Die Dissoziation des Acyl-Enzym-Komplexes ist bei entsprechenden Bedingungen vernachlässigbar klein. Die Konzentration des p-Nitrophenol läßt sich photometrisch bestimmen. Pro Mol Enzym wird bei dieser Methode ein Mol p-Nitrophenol freigesetzt. Schon daraus ist ersichtlich, daß diese Methode bei teuren Enzympräparaten unrentabel ist. Wir benutzten einen indirekten Weg: Die spezifische Aktivität des Trypsin beträgt beim BAPA-Test ca.  $1\text{U} \times \text{mg}^{-1}$ . Bei einem Molekulargewicht von 24 000 entspricht

$$1\text{U} = \frac{1 \times 10^{-3}}{24 \times 10^5} \text{ Mol} = 41,7\text{nMol Trypsin.}$$

Da die Proteinaseinhibitoren mit Plasmin und Trypsin äquimolare Komplexe bilden, entspricht 1IU nach Definition ebenfalls 41,7nMol Inhibitor.

Bestimmt man die spezifische Hemmaktivität des Inhibitors mittels des Trypsin/BAPA-Test, so kennt man die hemmaktiven Mole pro mg. Die Molarität einer Plasminlösung ist demnach gleich der Molarität des Inhibitors in dieser Lösung.

## 1.3. Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten nach GREEN & WORK

Die Stabilität eines Enzym-Inhibitor-Komplexes im Äquivalenzpunkt wird durch die Inhibitorkonstante  $K_i$  beschrieben.  $K_i$  wird durch

folgende Gleichung definiert: 
$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]} = \frac{[E_{\text{frei}}]^2}{[E_{\text{gesamt}}] - [E_{\text{frei}}]}$$

Die Konstante  $K_i$  nennt man Dissoziationskonstante eines Enzym-Inhibitor-Komplexes. Dabei gelten folgende Bedingungen: Freies Enzym und freier Inhibitor liegen im Gleichgewichtszustand in äquimolaren Konzentrationen vor. Temperatur, pH und Ionenstärke der Lösung sind

definiert.  $[E_{\text{frei}}]$  bedeutet dann die in diesem Zustand vorliegende Konzentration des nicht gebundenen Enzyms.  $[E_{\text{gesamt}}]$  ist die Summe der Konzentrationen von gebundenem und freiem Enzym.

Jeder Inhibitor-Enzym-Komplex ist charakterisiert durch einen  $K_i$ -Wert unter definierten Bedingungen. Demnach hat jeder Komplex eines Inhibitors mit verschiedenen Enzymen verschiedene Dissoziationskonstanten. Für unsere spezielle Fragestellung bedeutet das: Können wir Inhibitoren finden, deren Komplexe Dissoziationskonstanten mit Humanplasmin besitzen, die sich von den Dissoziationskonstanten der Komplexe mit Humanserumkallikrein unterscheiden? Gelingt es, solche Dissoziationskonstanten zu berechnen, verfügt man über quantifizierte Eigenschaften des betreffenden Enzym-Inhibitor-Systems.

Die methodische Schwierigkeit bei der Berechnung der Dissoziationskonstante liegt in der Bestimmung des freien Enzymanteils am Äquivalenzpunkt.

Unter bestimmten Voraussetzungen aber läßt sich folgende einfache Methode verwenden, die N.M.GREEN & E.WORK (4) angegeben haben: Bei der Titration einer Protease mit Inhibitor erhält man häufig eine lineare Aktivitätsabnahme der Enzymaktivität bis zu einem Bereich von ca. 20% der Anfangsaktivität. Dort knickt die Kurve ab und nähert sich asymptotisch der Abszisse (Abb. 3). Der Knick in der Geraden läßt sich damit erklären, daß das Gleichgewicht des im Überschuß von Enzym stabileren Inhibitor-Enzym-Komplexes nahe dem Äquivalenzpunkt (Verhältnis Enzymmolarität zu Inhibitormolarität nahe 1:1, Schnittpunkt der extrapolierten Geraden mit der Abszisse) zugunsten der dissoziierten Form verschoben wird. Der Anteil des freien Enzyms am Äquivalenzpunkt läßt sich aus der Kurve bestimmen:  $[E_{\text{frei}}]$  ist gleich dem Ordinatenabstand von extrapoliertem Äquivalenzpunkt bis zum Schnittpunkt mit der Kurve.  $[E_{\text{gesamt}}]$  ist gleich dem Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate (Inhibitorkonzentration 0).

Das geschilderte Verfahren ist anwendbar, wenn folgende Bedingungen (5, S.403) erfüllt sind:

1. Die Michaeliskonstante für das betreffende Substrat muß kleiner als  $10^{-4}M$  sein, damit keine Beeinflussung des Gleichgewichts z.B. durch Verdrängung von Inhibitormolekülen durch Substratmoleküle vom aktiven Zentrum des Enzyms erfolgt.

2.  $K_1^{-1} \times [E_{\text{gesamt}}]$  kleiner 8

3. Inhibition am Äquivalenzpunkt größer als 70%

In den Fällen, wo wir  $K_1$ -Werte bestimmt haben, waren diese Bedingungen erfüllt.

## 2. Material und Messungen

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Enzympräparate

1. Plasmin (Schwein) Novo Industri A/S
2. Forschungsplasmin KABI hochgereinigt (human, Trockensubstanz), Deutsche Kabi GmbH München, Charge 19074.  
"Die Aktivierung des als Grundstoff verwandten Plasminogens erfolgte in 50%iger Glycerol-Lösung nach Alkjaersig et al. (Biol.Chem. 233, 1958, 81), dann wurde dialysiert mit 0,05M Phosphatpuffer und anschließend lyophilisiert" (zitiert nach dem Firmenprospekt).
3. Trypsin
4. Alkoholdehydrogenase, Boehringer Mannheim, Suspension

#### 2.1.2. Inhibitoren

1. Trypsin-Kallikrein-Inhibitor aus Rinderorganen, Bayer AG (entspricht Trasylol<sup>R</sup>)
2. Soja-Bohnen-Inhibitor Merck (Kunitz SBI), E. Merck Darmstadt, Artikel 24020
3. Soja-Bohnen-Inhibitor, Serva Heidelberg; bestand zu 90% aus Bowman-Birk-SBI, zu 10% aus Kunitz-SBI (11)
4. Ovomucoid, Worthington Biochemical Corp. , Freehold, New Jersey
5. See-Anemonen-Inhibitor, Behringwerke Marburg (13)
6. Lima-Bohnen-Inhibitor (Fr. III), P-L Biochemicals, Inc. Milwaukee, Wisc.
7. Kartoffel-Inhibitor, Behringwerke Marburg Op.Nr. 151068

8. Meerschweinchen-Sperma-Inhibitoren
  - a) M I 12.13/14.08 (Trypsininhibitor)
  - b) M II 121.21 = 120.10d (Trypsin-Plasmin-Inhibitor)
  - c) M II 120.28 (hochgereinigt)
9. Schweine-Sperma-Inhibitor (Trypsin-Plasmin-Inhibitor)
10. Bdeilne-Trypsin-Plasmin-Inhibitoren
  - a) A
  - b) B
  - c) B<sub>3</sub>
11. Hirudin (Thrombin-Inhibitor)
12. Cow-Colostrum-Inhibitor (Trypsin-Chymotrypsin-Plasmin-Inhibitor)
13. Human-Sperma-Inhibitoren
  - a) I (Trypsin-Inhibitor)
  - b) II (Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitor)
14. Schweine-Pankreas-Inhibitor (Trypsin-Inhibitor)

### 2.1.3. Substrate

1. BAEE (N-alpha-benzoyl-L-argininäthylester), E. Merck Darmstadt; Lösung: 1mg in 1ml aqua dest.
2. BAPA (N-alpha-benzoyl-DL-arginin-4-nitroanilid), E. Merck Darmstadt; Lösung: 1mg in 1ml aqua dest.
3. NAD<sup>+</sup> (Beta-nicotinamid-adenin-dinukleotid), Boehringer Mannheim; Lösung: 20mg in 1ml aqua dest.

### 2.2. Messungen

#### 2.2.1. Bestimmung des pH-Optimum von Humanplasmin

Die Aktivität von 0,1mg Humanplasmin wurde in 0,1M TRA-Puffer bei verschiedenen pH-Werten bestimmt. Es ergab sich ein pH-Optimum von 7,5 (Abb.2). Die Aktivitätseinbuße bei pH 7,8 lag im Bereich der Meßfehler, so daß wir uns entschlossen, unsere Messungen wie bisher üblich bei pH 7,8 durchzuführen.

Die Aktivität bei pH 8,7 lag um 20% niedriger als beim Optimum. In dieser Größenordnung liegt auch der Aktivitätsverlust des Humanplasmin beim indirekten BAEE-Test.

### 2.2.2. Proportionalitätsbereich des Humanplasmin im direkten BAEE-Test

Es wurde geprüft, wie lange die Enzymaktivität im Ansatz linear ansteigt mit der eingesetzten Enzymmenge. Dieser Bereich durfte während der Messungen nicht verlassen werden.

Für den direkten BAEE-Test ergab sich dabei ein Bereich von 0 bis über 0,4mg Enzym im Ansatz entsprechend einer Aktivität von 0mU bis zu 55mU.

### 2.2.3. Einfluß von Ca- und Mg-Ionen und von EDTA auf die Aktivität des Humanplasmin

Zusatz von Ca- bzw. Mg-Ionen bis zu einer Endkonzentration von 10mval bzw. 4mval im Ansatz hatte keinen Einfluß auf die Aktivität des Humanplasmin.

In einer Konzentration von 1mM beeinflusste EDTA die Aktivität des Humanplasmin nicht.

### 2.2.4. Bestimmung der Molarität unseres Enzympräparates

Als Inhibitor verwendeten wir den Trypsin-Kallikrein-Inhibitor (TKI) der Bayer AG. Im Trypsintest fanden wir eine spezifische Aktivität des TKI von  $2,53 \text{ IU} \times \text{mg}^{-1}$ .

$2,53 \text{ IU} \times \text{mg}^{-1}$  entsprechen  $2,53 \times 41,7 = 106 \text{ nMol} \times \text{mg}^{-1}$  (1.2.).

1,04mg TKI hemmen - extrapoliert - 30,2 U Humanplasmin total.

1,04mg TKI entsprechen  $1,03 \times 106 = 110 \text{ nMol TKI}$ .

1 U Humanplasmin entspricht also  $110 \times (30,2)^{-1} = 3,64 \text{ nMol}$ .

3,64 nMol in 3ml entsprechen einer Molarität von

$$\frac{3,64 \text{ nMol}}{3 \text{ ml}} = 1,21 \text{ } \mu\text{Mol} \times \text{l}^{-1} = 1,21 \mu\text{M}.$$

Also entspricht 1mU Humanplasmin in 3ml einer Molarität von 1,21nM.

### 2.2.5. Titration von Humanplasmin mit den verschiedenen Inhibitoren

Von sämtlichen Inhibitoren (2.1.2.) wurde, nachdem ihre spezifische Aktivität mit Hilfe des Trypsin/BAPA-Tests (1.1.1.) bestimmt worden war, eine Titrationskurve aufgenommen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Meßbedingungen

Nach 2.2.1. ergaben sich optimale Meßbedingungen bei einem pH von 7,8 . Der Einsatz von 0,2mg Humanplasmin im Ansatz lag gut im Proportionalitätsbereich (2.2.2.).

Eine Aktivierung des Enzyms mit Ca- oder Mg-Ionen konnte nicht festgestellt werden. Ein entsprechender Zusatz zum Reaktionsansatz erübrigte sich also. Eine Hemmung durch Schwermetallionen in sehr niedriger Konzentration wurde ebenfalls nicht gefunden (EDTA-Versuch, 2.2.3.).

#### 3.2. Enzymmolarität im Küvettenansatz

Bezogen auf das Endvolumen von 3ml unseres Küvettenansatzes entsprach 1mU in der Küvette einer Molarität von 1,21nM (2.2.4.).

#### 3.3. Aktivität und Reinheit des verwendeten Humanplasmin

Die Aktivität der im Test eingesetzten 0,2mg Humanplasmin betrug im Durchschnitt 30,8mU.

Dies entspricht  $30,8 \times 3,64 = 112\text{pMol}$  Humanplasmin (2.2.4.).

Bei einem Molekulargewicht von 75 400 entsprechen 0,2mg

$200 : 75,4 = 2,66\text{nMol}$  reinem Humanplasmin.

Unser Enzympräparat enthielt also  $0,112 : 2,66 = 0,042$  entsprechend 4,2% reines, aktives Humanplasmin.

Wie dieser Anteil verbessert werden kann, wird im Anhang gezeigt.

#### 3.4. Die Auswertung der Titrationskurven

Sämtliche Kurven wurden graphisch ausgewertet. Wo es möglich war, wurde das freie Enzym am Äquivalenzpunkt bestimmt. Die Titrationskurven von vier Inhibitoren erwiesen sich als dafür geeignet. Eine weitere war nur bedingt geeignet. Die Dissoziationskonstanten dieser Inhibitoren wurden berechnet. Die Resultate findet man in Tabelle 2. Abbildung 3 zeigt eine Kurve, bei der das freie Enzym am Äquivalenzpunkt gut betimmt werden konnte.

Bei den anderen Inhibitoren beschränkten wir uns darauf, die Menge

an Inhibitoren zu bestimmen, die für eine 50%ige Hemmung notwendig war. Die Abbildungen 4 bis 8 geben entsprechende Kurven wieder, Tabelle 1 die Resultate.

#### 4. Vergleich des Hemmverhalten von Humanserumkallikrein mit dem Verhalten des Humanplasmin

Die Ergebnisse von WUNDERER (12) lassen sich mit unseren nur bedingt vergleichen, da WUNDERER im allgemeinen auf eine quantitative Beschreibung der Hemmwirkung eines Inhibitors auf Humanserumkallikrein verzichten mußte, da die Dissoziationskonstanten zu groß waren, um sich mit hinreichender Genauigkeit bestimmen zu lassen. Trotzdem lassen sich an Hand der von WUNDERER gegebenen Tabelle wesentliche Unterschiede im Hemmverhalten von Humanplasmin und Humanserumkallikrein herausarbeiten. In Tabelle 3 und 4 sind WUNDERERS Ergebnisse den unseren gegenübergestellt.

Aus Tabelle 3 ergibt sich, daß Humanserumkallikrein nur von wenigen der bekannten Proteaseninhibitoren gehemmt wird, während Humanplasmin offensichtlich in geeigneter Konzentration von fast allen Proteaseinhibitoren gehemmt werden kann. Schon in dieser qualitativen Übersicht wird es klar, daß es keine Schwierigkeiten bereitet, bei Experimenten mit Humanserumkallikrein störende Einflüsse eventuell vorhandenen Humanplasmins durch Zugabe geringer Mengen eines spezifischen Humanplasmininhibitors wie z.B. des Bdelline A auszuschalten. Mit anderen Worten: Ändert die Zugabe von Bdelline A das Ergebnis eines Versuchs mit Humanserumkallikrein, so ist wahrscheinlich vorhandenes Humanplasmin oder eine andere, plasmin-ähnliche Proteinase dafür verantwortlich. Die Wirkung des Humanplasmin läßt sich ermitteln als die Differenz beider Versuchsergebnisse.

Umgekehrt wird es sich dann um die Aktivität von Humanserumkallikrein handeln, wenn in einem Versuch mit Humanplasmin nach der Zugabe von genügend Bdelline A eine Restaktivität bestehen bleibt. Das Ziel dieser Arbeit, Bedingungen zu finden, unter denen sich die Wirkungen des Humanplasmin von den Wirkungen des Humanserumkallikrein unterscheiden lassen, ist damit erreicht.

Weiter erlaubt Tabelle 4 sogar quantitative Aussagen: WUNDERER konnte für die Komplexe des TKI und des Kunitz-SBI mit Humanserumkallikrein die Dissoziationskonstanten berechnen. Seine Werte, verglichen mit den unseren, zeigen, daß die Dissoziationskonstanten der Komplexe mit Humanplasmin bis zu drei Zehnerpotenzen kleiner sein können als die mit Humanserumkallikrein. In Verbindung mit den Ergebnissen von Tabelle 3 wird man daher die Aussage wagen können, daß Humanplasmin generell eine höhere Affinität zu Proteaseninhibitoren besitzt als das Humanserumkallikrein.

#### Anhang - Affinitätschromatographie mit Humanplasmin

Wir hatten festgestellt, daß das verwendete Humanplasmin nur zu 4,2% aktiv war (3.3.). Um zu zeigen, daß es durch einen einfachen Schritt möglich ist, eine wesentliche Anreicherung eines solchen Enzympräparates zu erzielen, entschlossen wir uns daher, mit dem Plasminpräparat noch eine Affinitätschromatographie durchzuführen.

Das Prinzip der Affinitätschromatographie (9, 10) von Proteasen besteht darin, daß ein Inhibitor der betreffenden Protease an ein wasserunlösliches Harz gebunden wird. Die Stabilität der Inhibitor-Harz-Verbindung muß unter allen Bedingungen größer sein als die des Enzym-Inhibitor-Komplexes. Der an das Harz gebundene Inhibitor behält seine Fähigkeit, mit der Protease einen unter geeigneten Bedingungen stabilen Enzym-Inhibitor-Komplex zu bilden. Bringt man in eine Proteasenlösung von neutralem pH die Inhibitor-Harz-Verbindung, so wird das aktive Enzym über den Inhibitor an das Harz gebunden. Die Verunreinigungen lassen sich auswaschen. Das reine Enzym wird bei saurem pH (hohe Dissoziation des Enzym-Inhibitor-Komplexes) ausgewaschen und geeignet konserviert.

#### 1. Material

Wir verwendeten 50mg eines Harzes, bei dem Soja-Bohnen-Inhibitor (Kunitz) an Aminoalkylcellulose gebunden war. Das Präparat mit der Nummer Mü VI 76/3 stellte uns die Firma E.Merck, Darmstadt, zu Verfügung.

Zwei Puffer fanden Verwendung:

Puffer I : 0,05M TRA, 0,5M NaCl, pH 7,8

Puffer II : 0,5M KCl/HCl, pH 2,0

## 2. Methode

Bei der Affinitätschromatographie muß man im Säulenverfahren arbeiten, wenn die Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes groß ist (9). Ist sie aber klein wie in unserem Falle ( $K_i$ , Kunitz-SBI, Humanplasmin =  $5,4 \times 10^{-10}M$ ) (Tabelle 2), kann man im "batch"-Verfahren arbeiten, d.h. das Harz wird in einem, nicht von verschiedenen Lösungen durchflossenen, Behälter behandelt. Durch Abzentrifugieren wird es zurückgewonnen. Wir arbeiteten im Batch-Verfahren.

### 2.1. Entfernen löslicher Anteile aus dem Harz

- 2.1.1. Das Harz wurde in 5 Gängen mit 25ml Puffer I gewaschen. Im abzentrifugierten Überstand fand sich keine inhibitorische Aktivität.
  - 2.1.2. Das Harz wurde mit 7ml Puffer I über Nacht bei 4°C stehen gelassen. Die inhibitorische Aktivität im gesamten Überstand betrug 6,8mIU (BAPA/Trypsin).
  - 2.1.3. Das Harz wurde in 2 Gängen mit 10ml 0,5% Caseinlösung nach Hammarstein gewaschen.
  - 2.1.4. Gewaschen mit 10ml Puffer I.
  - 2.1.5. Gewaschen mit 15ml Puffer II. Inhibitorische Aktivität im Überstand 27mIU.
  - 2.1.6. Gewaschen mit 27ml Puffer I. Inhibitorische Aktivität 18,5mIU.
- Durch das Waschen verlor das Harz ca. 55mIU (BAPA/Trypsin). dies entspricht nach Tabelle 1  $55 : 1,3 = 42\mu g$  SBI.

### 2.2. Beladen des Harzes

- 2.2.1. Herstellung, Aktivitätsbestimmung und Proteingehalt der Humanplasminlösung

2.2.1.1. Herstellung: 153,55mg Humanplasmin wurden in 6ml Puffer I gelöst.

2.2.1.2. Bestimmung der Gesamtaktivität:

Die Aktivität der Plasminlösung bestimmten wir mit dem indirekten BAEE-Test. Als Maß für die Aktivität verwendeten wir Extinktionseinheiten (E) pro Minute.

Die Lösung 2.2.1.1. hatte eine Aktivität von  $7,10 \text{ E} \times (\text{ml} \times \text{min})^{-1}$ .

2.2.1.3. Proteingehalt:

Der Proteingehalt der Lösungen wurde mit Hilfe der Extinktion der Proteine bei 280nm bestimmt. Gemessen wurde mit dem Zeiss-Spektralphotometer PM Q II. Für das verwendete Plasminprotein wurde eine Eichkurve aufgenommen: Einer Extinktion von 0,001 entsprach eine Konzentration von  $2,70 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ . Die Lösung 2.2.1.1. hatte einen Proteingehalt von  $25,6 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$ . Die spezifische Aktivität des Plasmin in Lösung 2.2.1.1. beträgt also

$$\frac{7100}{25,6} = 0,278 \text{ E} \times (\text{min} \times \text{mg})^{-1}.$$

2.2.2. Spezifischer Bindungsschritt

Auf die 50mg Harz wurden 5ml Lösung 2.2.1.1. =  $35,5 \text{ E} \times \text{min}^{-1}$  = 128mg Protein aufgetragen und 15min im Eisbad gerührt.

2.2.3. Zentrifugieren

Wir erhielten mit Hilfe einer Kühlzentrifuge 4,95ml Zentrifugat, dessen Gesamtaktivität  $12,25 \text{ E} \times \text{min}^{-1}$  betrug.

Der Gesamtproteingehalt betrug 71mg, die spezifische Aktivität des Zentrifugatplasmin  $0,173 \text{ E} \times (\text{min} \times \text{mg})^{-1}$ .

Das Zentrifugat enthielt 55,5% des eingesetzten Protein. Seine Aktivität an Plasmin betrug 35% der eingesetzten Plasminaktivität. Es gingen bei diesem Schritt also 35% des aktiven Plasmin verloren.

2.2.4. Auswaschen des inaktiven Protein

2.2.4.1. Es wurde mit 15ml Puffer I gewaschen.

Zentrifugat: 14,75ml; Proteingehalt: 29,8mg;

Aktivität:  $3,1 \text{ E} \times \text{min}^{-1}$ ;

spezifische Aktivität:  $0,104 \text{ E} \times (\text{min} \times \text{mg})^{-1}$

2.2.4.2. Gewaschen mit 10ml Puffer I; 9,8ml Zentrifugat;  
Aktivität  $0,7 \text{ E} \times \text{min}^{-1}$ ; Proteingehalt 9,3mg;  
spezifische Aktivität  $0,075 \text{ E} \times (\text{min} \times \text{mg})^{-1}$ .

## 2.2.5. Dissoziation des Enzym-Inhibitor-Komplexes

### 2.2.5.1. Fraktion I:

Gewaschen mit 5ml Puffer II; 4,9ml Zentrifugat;  
Aktivität  $4,92 \text{ E} \times \text{min}^{-1}$ ; Proteingehalt 2,09mg;  
spezifische Aktivität  $2,35 \text{ E} \times (\text{min} \times \text{mg})^{-1}$ .

Der Anreicherungsfaktor gegenüber Lösung 2.2.1.1. beträgt

$$\frac{2,35}{0,278} = 8,46. \text{ Die Ausbeute an aktivem Plasmin beträgt}$$

$$\frac{4,92}{35,5} = 0,139 \text{ entsprechend } 13,9\%.$$

### 2.2.5.2. Fraktion II:

Gewaschen mit 5ml Puffer II; 4,7ml Zentrifugat;  
Aktivität  $6,6 \text{ E} \times \text{min}^{-1}$ ; Proteingehalt 3,44mg;  
spezifische Aktivität  $1,92 \text{ E} \times (\text{min} \times \text{mg})^{-1}$ ; Anreicherung  
gegenüber 2.2.1.1. Faktor 6,9 und Ausbeute 18,6%.

### 2.2.5.3. Fraktion III:

Gewaschen mit 5ml Puffer II; 4,8ml Zentrifugat;  
Aktivität  $1,175 \text{ E} \times \text{min}^{-1}$ ; Proteingehalt 3,78mg;  
spezifische Aktivität  $0,312 \text{ E} \times (\text{min} \times \text{mg})^{-1}$ ; Anreiche-  
rungsfaktor 1,12 und Ausbeute 3,3%.

## 2.2.6. Konservierung

Fraktion I und II wurden vereinigt und tiefgefroren.

## 3. Ergebnis

Es wurden 128mg Humanplasmin mit 50mg SBI-Harz aufbereitet. Das Präparat war vor der Affinitätschromatographie zu 4,2% aktiv. Im Schritt 2.2.5.1. wurde bei einer Ausbeute von 13,8 % eine Anreicherung um das 8,46fache erzielt. Wir erhielten somit ein Präparat von  $4,2 \times 8,46 = 35,5\%$  Reinheit.

Addiert man die Aktivitäten der Zentrifugate, erhält man  $28,75 \text{ E} \times \text{min}^{-1}$ .  $35,5 - 28,75 = 6,75 \text{ E} \times \text{min}^{-1}$  entsprechend 19% des eingesetzten Plasmin wurden demnach denaturiert oder verblieben am Harz. Die vereinigte Ausbeute von Fraktion I und II betrug 32,5%. Das nächste Ziel wird es sein, diese Ausbeute zu verbessern.

# Abbildungen

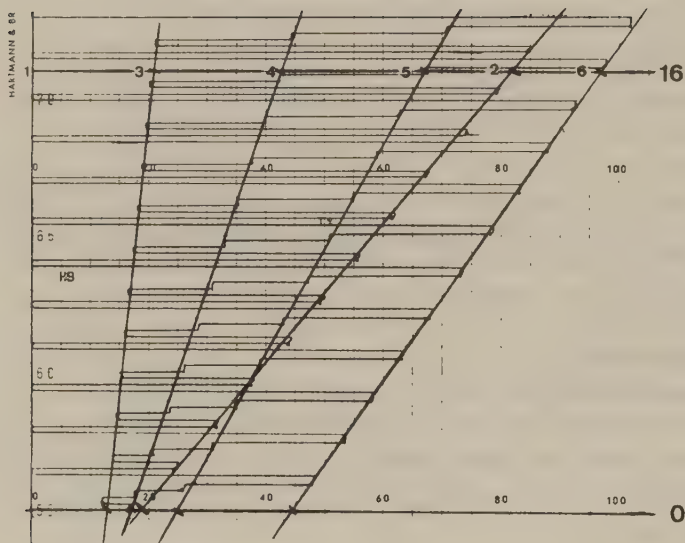


Abbildung 1

Schreiberprotokoll des PM Q II: Titration von Humanplasmin mit  
Soja-Bohnen-Inhibitor (Kunitz)

| Ansatz  |                |             |                      |              | Ergebnis     |
|---------|----------------|-------------|----------------------|--------------|--------------|
| Küvette | Puffer<br>(ml) | SBI<br>(µg) | Humanplasmin<br>(µg) | BAEE<br>(ml) | ΔE pro 10min |
| 1       | 2,5            | ---         | ---                  | 0,5          | 0,0          |
| 2       | 2,4            | ---         | 200                  | 0,5          | 0,126        |
| 3       | 2,1            | 1,5         | 200                  | 0,5          | 0,016        |
| 4       | 2,2            | 1,0         | 200                  | 0,5          | 0,051        |
| 5       | 2,3            | 0,5         | 200                  | 0,5          | 0,084        |
| 6       | 2,35           | 0,25        | 200                  | 0,5          | 0,105        |

Meßdauer 10min bei einem Papiervorschub von 16cm (0 - 16),  
Skalenspreizung 0,2 Extinktionseinheiten (0 - 100).

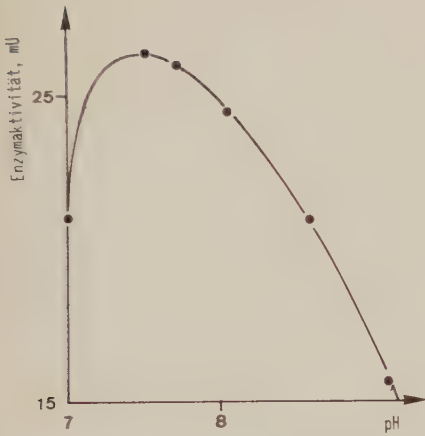


Abbildung 2

pH-Optimum des Humanplasmin,  
experimentelle Bedingungen  
siehe Seite 12

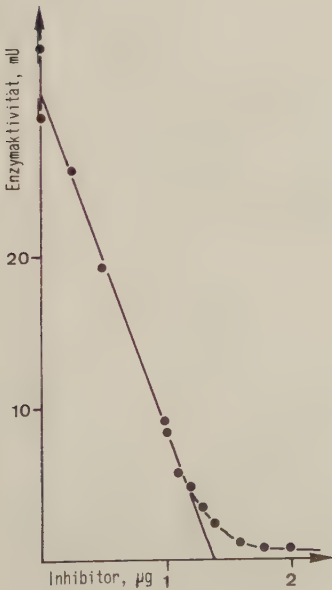


Abbildung 3

Titration von Humanplasmin  
mit Seeanemonen-Inhibitor,  
exp. Bed. s. S. 7, 10 u. 14

$$[E_{\text{gesamt}}] = 31 \text{ mU} = 37,7 \text{ nM}$$

$$[E_{\text{frei}}] = 2,3 \text{ mU} = 2,9 \text{ nM}$$

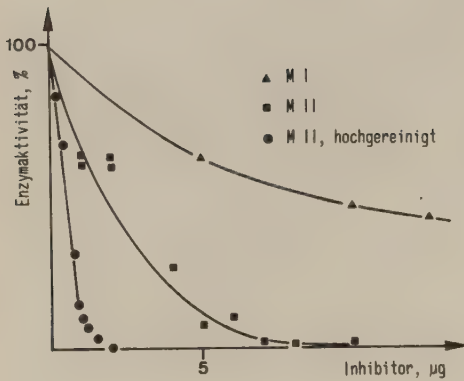


Abbildung 4

Titration von Humanplasmin  
mit Meerschweinchen-Sper-  
ma-Inhibitoren, experimen-  
telle Bedingungen S. 15

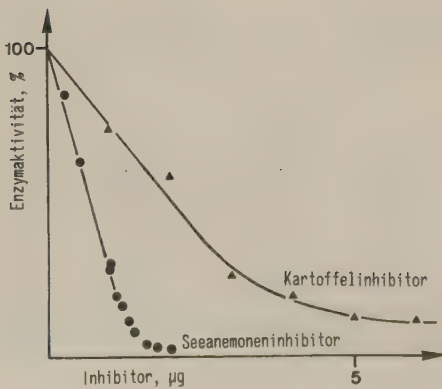


Abbildung 5

Titration von Humanplasmin  
mit Kartoffel- und Seeane-  
monen-Inhibitor, experimen-  
telle Bedingungen S.15

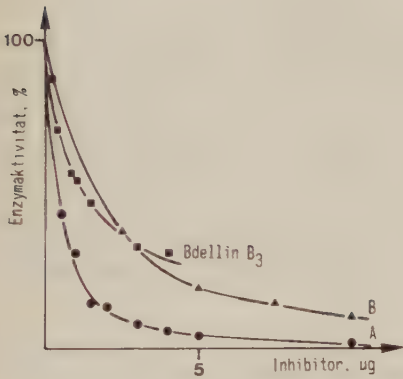


Abbildung 6

Titration von Humanplasmin mit Bdeiline-Inhibitoren, experimentelle Bedingungen S.15

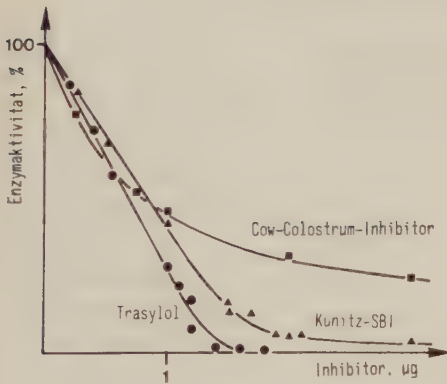


Abbildung 7

Titration von Humanplasmin mit TKI (Trasylol), Cow-Colostrum-Inhibitor und Soja-Bohnen-Inhibitor (Kunitz), experimentelle Bedingungen S.15

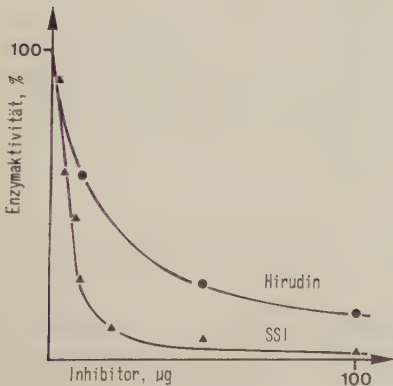


Abbildung 8

Titration von Humanplasmin mit Hirudin und Schweine-Sperma-Inhibitor, experimentelle Bedingungen S.15

Tabellen

Tabelle 1 : Auswertung der Titrationskurven

Spalte I: spezifische Aktivität im BAPA/Trypsin-Test in IU pro mg

II: eingesetzte Inhibitormenge in µg

III: eingesetztes Humanplasmin in pMol

IV: Hemmung der Aktivität des Humanplasmin in %

| Inhibitoren                  | I    | II    | III   | IV              |
|------------------------------|------|-------|-------|-----------------|
| 1. Trypsin-Kallikrein-I.     | 2,53 | 0,60  | 110   | 50              |
| 2. Kunitz-SBI                | 1,3  | 0,9   | 116   | 50              |
| 3. Bowman-Birk-SBI           | 1,2  | 9,0   | 94    | 50 <sup>+</sup> |
| 4. Ovomuroid                 | ---  | 100   | 113   | 0               |
| 5. Seeanemonen-I.            | 3,3  | 0,69  | 113   | 50              |
| 6. Lima-Bohnen-I.            | ---  | 7,5   | 90    | 50              |
| 7. Kartoffel-I.              | ---  | 1,85  | 114   | 50              |
| 8. Meerschweinchen-Sperma-I. |      |       |       |                 |
| a) M I                       | 3,1  | 10    | 101   | 50              |
| b) M II                      | ---  | 2,75  | 119   | 50              |
| c) M II hochgereinigt        | 3,6  | 0,55  | 125   | 50              |
| 9. Schweine-Sperma-I.        | 1,7  | 5,75  | 94,5  | 50              |
| 10. Bdelline-I.              |      |       |       |                 |
| a) A                         | 3,8  | 0,375 | 113,5 | 50              |
| b) B                         | ---  | 1,75  | 113,5 | 50              |
| c) B <sub>3</sub>            | 5,1  | 1,25  | 117   | 50              |
| 11. Hirudin                  | ---  | 14    | 123   | 50              |
| 12. Cow-Colostrum-I.         | 2,3  | 0,75  | 123   | 50              |
| 13. Human-Sperma-I.          |      |       |       |                 |
| a) I                         | 1,4  | 50    | 113,5 | 15              |
| b) II                        | 1,5  | 50    | 113,5 | 68              |
| 14. Schweine-Pankreas-I.     | ---  | 50    | 62    | 60              |

+) Wirkung des Kunitz-SBI (11)

Tabelle 2 : Berechnete Dissoziationskonstanten

| Inhibitor         | [E <sub>gesamt</sub> ]<br>nM | [E <sub>frei</sub> ]<br>nM | K <sub>i</sub><br>10 <sup>-10</sup> M |
|-------------------|------------------------------|----------------------------|---------------------------------------|
| 1. TKI            | 36,7                         | 2,8                        | 2,3                                   |
| 2. Kunitz-SBI     | 37,7                         | 4,4                        | 5,4                                   |
| 3. Seeanemonen-I. | 37,7                         | 2,9                        | 2,4                                   |
| 4. M II hochger.  | 41,7                         | 3,5                        | 3,2                                   |
| 5. Bdelline A     | 37,8                         | 4,9                        | ca. 7,3 <sup>+</sup>                  |

+) Bedingung 2 (1.3.) nicht erfüllt

Tabelle 3 : Vergleich der Hemmbarkeit von Humanserumkallikrein (12) und Humanplasmin durch Proteaseinhibitoren

| Inhibitor            | 10mU Humanserumkallikrein |         | 30mU Humanplasmin |         |
|----------------------|---------------------------|---------|-------------------|---------|
|                      | µg Inhibitor              | Hemmung | µg I.             | Hemmung |
| 1. TKI               |                           | +       | 0,6               | 50%     |
| 2. Kunitz-SBI        |                           | +       | 0,9               | 50%     |
| 3. Bowman-Birk-SBI   | 21                        | Ø       |                   | Ø       |
| 4. Ovomucoid         | 200                       | Ø       | 100               | Ø       |
| 5. Seeanemonen-I.    | 100                       | +       | 0,7               | 50%     |
| 6. Lima-Bohnen-I.    | 500                       | Ø       | 7,5               | 50%     |
| 7. Kartoffel-I.      | 700                       | Ø       | 1,85              | 50%     |
| 8. Bdelline A        | 200                       | Ø       | 0,375             | 50%     |
| 9. Bdelline B        | 200                       | Ø       | 1,75              | 50%     |
| 10. Hirudin          | 1000                      | Ø       | 14                | 50%     |
| 11. Cow-Colostrum-I. | 250                       | Ø       | 0,75              | 50%     |

+ Hemmung, Ø keine Hemmung

Tabelle 4 : Dissoziationskonstantenvergleich

|                           | TKI                                      | Kunitz-SBI                |
|---------------------------|------------------------------------------|---------------------------|
| Humanserumkallikrein (12) | K <sub>i</sub> = 1 x 10 <sup>-7</sup>    | 5 x 10 <sup>-9</sup> M    |
| Humanplasmin              | K <sub>i</sub> = 2,3 x 10 <sup>-10</sup> | 5,4 x 10 <sup>-10</sup> M |

## Literatur

1. G.H. Barlow, L. Summaria & K.C. Robbins, J.Biol.Chem. 244, 1138 (1969) zitiert bei K.C. Robbins & L. Summaria in G.E. Perlmann & L. Lorand (Hrsg.), Methods in Enzymology Vol. 19, Academic Press 1970, S. 184 - 198
2. V. Eisen, Proc.roy.Soc. 173, 407 (1969c) zitiert bei V. Eisen & W. Vogt in E. Erdös (Hrsg.), Handbook in Experimental Pharmacology Vol. 15, Springer 1970, S. 82 - 130
3. Back & Steger, Fes.Proc. 27, 96 (1968), ebendort zitiert
4. N.M. Green & E. Work, BJ 54, 347 (1953)
5. M. Laskowski, Jr. & R.W. Sealock in P. Boyer (Hrsg.), The Enzymes Vol. 3, 3rd Edition, Academic Press 1971, S. 376 - 410
6. I. Trautschold, H. Fritz & E. Werle in Hypotensive Peptides S. 221, Springer 1966 zitiert bei H.U. Bergmeyer (Hrsg.), Methoden der enzymatischen Analyse, Verlag Chemie, Weinheim 1970, S. 1024
7. Die Theorie des enzymatischen Tests, Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica 1971
8. I. Trautschold & E. Werle, Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 325, 49 (1961)
9. H.D. Orth & W. Brümmer, Angew.Chem. 84, 319 - 330 (1972)
10. H. Fritz, B. Brey, A. Schmal & E. Werle, Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem. 350, 617 (1969)
11. G. Wunderer & M. Meier, unveröffentlicht
12. G. Wunderer, Diplomarbeit, Technische-Universität-München 1972
13. H. Fritz, B. Brey & L. Béress, Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem. 353, 19 - 30 (1972)

Herrn Privatdozent Dr.rer.nat. Johann Fritz sei herzlich gedankt für seine verlässliche und tatkräftige Unterstützung bei der Auswahl des Dissertationsthemas und bei der Lösung experimenteller Probleme.

Herr Dr.med. Manfred Eulitz vom Institut für Hämatologie der GSF stellte höchst dankenswerterweise sein Spektralphotometer für die direkten BAEE-Teste zur Verfügung.

Die Firmen Deutsche Kabi GmbH und E. Merck, Darmstadt, unterstützten uns in der Beschaffung des Plasminpräparates und des Inhibitorharzes.



## Lebenslauf

22. 7. 1948 geboren in Marburg an der Lahn

Sommer 1957 Umzug nach Berlin

Ostern 1968 Reifeprüfung in Berlin

Beginn des Medizinstudiums in Berlin

März 1969 Vorphysikum in Berlin

Herbst 1969 Fortsetzung des Medizinstudiums an der Universität München

Sommer 1970 Physikum in München

19.12. 1973 Staatsexamen in München









